

論文内容の要旨

論文提出者氏名 原田 憲一

論文題目

Detection of Lymph Node Metastases in Human Colorectal Cancer by Using 5-Aminolevulinic Acid-Induced Protoporphyrin IX Fluorescence with Spectral Unmixing.

論文内容の要旨

大腸直腸癌のリンパ節転移個数と生存率の関係は重要である。患者の予後と治療にとって外科的に摘出されたリンパ節の正確な診断が必要である。リンパ節転移の検出方法として、組織病理学的解析は標準的な方法として行われている。しかしながら、組織病理学的解析では、大腸直腸癌転移の検出に対する感度には限界がある。病理学的検査における転移検出の過小評価の危険が指摘されている。したがって、摘出したリンパ節転移巣の検出に対する新しい方法が求められている。

5-aminolevulinic acid(以下、5-ALA)を使用した蛍光診断は脳腫瘍や尿管・膀胱癌などの原発巣診断に用いられてきた。5-ALA 投与後の ProtoporphyrinIX (以下、PpIX) の蛍光は、原発の上皮性悪性腫瘍に対して選択的に蓄積する。非癌細胞においては、PpIX の蛍光は、蛍光を有しないヘムに速やかに代謝される。それと比較して、癌細胞においては、選択的に蓄積され、青色光の励起に対して 635nm 付近の赤い蛍光を放つ。これは、癌細胞におけるフェロケラターゼの活性の低下とポルフォビリノーゲンデアミナーゼの活性の増加によるものである。

我々は、以前に、直腸癌マウスモデルにおいて 5-ALA はリンパ節転移の検出に対する感度の高いプローブであり、その診断精度は高いことを報告した。しかしながら、我々の知り得る限り、5-ALA の投与が、ヒト大腸直腸癌リンパ節転移の検出に効果的かどうかの報告はまだされていない。

この研究では、大腸直腸癌患者から摘出されたリンパ節における転移病巣の描出に対して、5-ALA の経口投与の可能性を評価するものである。我々は、以前に胃癌患者のリンパ節において、PpIX の蛍光が強い自家蛍光によって覆われてしまうことを示した。それゆえに、PpIX の蛍光を検出するためには自家蛍光を取り除くことが重要である。この研究では、Spectral Unmixing によって自家蛍光の crosstalk を除去し、ヒト大腸直腸癌リンパ節転移における PpIX の特異的な検出を行うことが目的である。

対象は、2009 年 6 月から 2011 年 2 月までの間で、京都府立医科大学付属病院で

手術を施行された TNM 分類で T2 以上の大腸直腸癌患者である。20ml のブドウ糖で溶解された 5-ALA ハイドロクロライドを、手術 2 時間前に 15mg/kg の濃度で経口投与した。患者は、5-ALA 投与後、24 時間直射日光に当たらないようにした。研究は、5-ALA 投与後 5～9 時間でリンパ節が摘出された症例で行われた。

Spectral Unmixing に用いたシステムは、monochrome CCD camera (ORCA-ER; Hamamatsu Photonics) と macrozoom fluorescence microscope (MVX-10; Olympus) で構成された。Fluorescence mirror unit は、excitation bandpass filter (BP400-410; Olympus)、455nm cutoff の barrier filter (BA455; Olympus) と dichroic mirror (DM455; Olympus)。Mercury lamp (USH1030; Olympus) が蛍光励起に用いられた。分光画像は、480nm～700nm まで 20nm 毎に tunable filter (Varispec, CRi) を用いて取得された。DMSO に溶解された 0.07 μ m PpIX 溶液と collagen powder の reference spectra がこのシステムで取得され、リンパ節における PpIX の Unmix 画像と 640nm bandpass filter 画像の最大値が蛍光診断の解析に用いられた。

最終的に、大腸直腸癌に対して手術を施行した 14 人の患者から摘出された合計 87 個のリンパ節が今回の研究で用いられた。手術の平均時間は 4.05 ± 1.03 時間、5-ALA 投与から蛍光診断までの平均時間は 6.18 ± 1.03 時間であった。男性 9 人、女性 5 人であった。87 個のリンパ節のうち、H&E 染色による病理診断で 32 個が転移リンパ節、55 個が非転移リンパ節と診断された。

転移リンパ節の平均 PpIX シグナル (1817 ± 1309 arb. units) は、非転移リンパ節の平均 PpIX シグナル (178 ± 168 arb. units) に対して有意に高かった(unpaired Student's *t* test, $p < 0.0001$)。

Spectral Unmixing を用いた蛍光輝度を基にした診断方法の有効性を評価するために、ROC 解析を行った。スペクトラルアンミキシングの感度、特異度、正確度はそれぞれ 88.3%, 92.0%, 87.4%であった。スペクトラルアンミキシングと 640nm バンドパスフィルターの AUC は、それぞれ 0.95 と 0.90 であった ($p=0.009$)。

この研究で、我々は、スペクトラルアンミキシングによって処理した 5-ALA 誘導 PpIX 蛍光シグナルがヒト大腸直腸癌リンパ節転移の検出に有用であることを示した。

最近、PCR のようないくつかの遺伝子的分子手法が臨床的に応用されている。それらの方法は、癌患者のリンパ節転移を非常に良く検出している。しかしながら、その過程において、手術で摘出されたリンパ節サンプルは溶解され、失われてしまったため、繰り返して解析を行うことは不可能である。一方、我々の方法で観察された標本は、摘出されたリンパ節の転移を肉眼的に同定できる。また、PpIX 蛍光イメージングと組織学的検査の組み合わせはリンパ節転移の正確な診断に対して応用可能である。